

**PCT**WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁷ : C12N 15/56, 15/12, 15/62, 9/36, C07K 14/47, A61K 38/47, A61P 11/00, 31/04 // A01K 67/027	A1	(11) International Publication Number: WO 00/29588 (43) International Publication Date: 25 May 2000 (25.05.00)
(21) International Application Number: PCT/US99/27403 (22) International Filing Date: 18 November 1999 (18.11.99) (30) Priority Data: 09/193,877 18 November 1998 (18.11.98) US 09/440,742 16 November 1999 (16.11.99) US (71) Applicant: CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER [US/US]; 3333 Burnet Avenue, Cincinnati, OH 45229 (US). (72) Inventors: WEAVER, Timothy, Edward; 1217 Fawn Court, Loveland, OH 45140 (US). AKINBI, Henry, Toyin; 346 Fleming Road, Cincinnati, OH 45215 (US). (74) Agents: JOSEPHIC, David, J. et al.; Wood, Herron & Evans, L.L.P., 2700 Carew Tower, Cincinnati, OH 45202 (US).	(81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>	
(54) Title: LYSOZYME FUSION PROTEINS IN INFECTIONS (57) Abstract <p>A method and composition for prophylaxis and/or therapeutic treatment of bacterial infections, particularly respiratory bacterial infections. A fusion protein of lysozyme and the carboxyl terminal propeptide of surfactant protein-B (SP-B) with the preceding ten amino acids of the mature SP-B peptide, or recombinant lysozyme alone, is administered in a pharmaceutically acceptable medium to an individual. The fusion protein or recombinant lysozyme may be selected so as to deliver it to a target infection site, such as the lungs or gastrointestinal tract. The method and composition eliminates problems associated with conventional antibiotic treatments, such as inefficacy and promotion of antibiotic resistant bacterial strains.</p>		

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-530083

(P2002-530083A)

(43) 公表日 平成14年9月17日 (2002.9.17)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 9/12	4 B 0 2 4
A 6 1 K 9/12		A 6 1 P 1/00	4 B 0 5 0
38/46		11/00	4 C 0 7 6
A 6 1 P 1/00		31/04	4 C 0 8 4
11/00		C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-582571 (P2000-582571)
 (86) (22) 出願日 平成11年11月18日 (1999.11.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成13年5月17日 (2001.5.17)
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 9 / 2 7 4 0 3
 (87) 国際公開番号 W O 0 0 / 2 9 5 8 8
 (87) 国際公開日 平成12年5月25日 (2000.5.25)
 (31) 優先権主張番号 0 9 / 1 9 3 , 8 7 7
 (32) 優先日 平成10年11月18日 (1998.11.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (31) 優先権主張番号 0 9 / 4 4 0 , 7 4 2
 (32) 優先日 平成11年11月16日 (1999.11.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 チルドレンズ ホスピタル メディカル
センター
アメリカ合衆国45229-3039 オハイオ州,
シンシナティ, バーネット アベニュー
3333
 (72) 発明者 ウイーバー、ティモシイ、エドワード
アメリカ合衆国 オハイオ、ラブランド、
フォーン コート 1217
 (72) 発明者 アキンビイ、ヘンリイ、トイイン
アメリカ合衆国 オハイオ、シンシナ
ティ、フレミング ロード 346
 (74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 感染におけるリゾチーム融合タンパク質

(57) 【要約】

細菌感染、特に呼吸器官細菌感染の予防および/または治療処置のための方法および組成物。リゾチームおよびサーファクタントタンパク質-B (S P-B) のカルボキシル末端プロペプチドと成熟S P-B ペプチドの先行する10個のアミノ酸との融合タンパク質、もしくは単独の組換えリゾチームは、医薬上で許容される媒質中で、個人に投与される。この融合タンパク質または組換えリゾチームは、標的感染部位、例えば肺または胃腸器官などに送達されるように選択することによってできる。この方法および組成物は、慣用の抗生物質処置に付随する問題、例えば無効性および抗生物質耐性菌種の増殖などの問題を解決する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：3および配列番号：6からなる群から選択されるリゾチーム／サーファクタントタンパク質B融合タンパク質を含有する組成物。

【請求項2】 配列番号：1の組換えリゾチームを含有する組成物。

【請求項3】 哺乳動物における細菌感染の予防的または治療的処置用の請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】 呼吸器系細菌感染の予防的または治療的処置用の請求項1または2に記載の組成物。

【請求項5】 上記呼吸器系感染が嚢胞性繊維症を患う哺乳動物における感染である請求項4に記載の組成物。

【請求項6】 哺乳動物における胃腸器官感染の予防的または治療的処置用の請求項1に記載の組成物。

【請求項7】 哺乳動物において抗細菌活性を有する配列番号：3および配列番号：6からなる群から選択される融合タンパク質。

【請求項8】 哺乳動物において抗細菌活性を有する配列番号：1の組換えリゾチーム。

【請求項9】 哺乳動物における細菌感染の予防的または治療的処置方法であって、医薬上で許容される担体中の配列番号：1の組換えリゾチームならびに医薬上で許容される担体中の配列番号：3および配列番号：6からなる群から選択されるリゾチーム／サーファクタントタンパク質-B融合タンパク質からなる群から選択される組成物を、上記感染の予防または治療に十分な用量で上記哺乳動物に投与することを包含する、上記方法。

【請求項10】 組成物を吸入およびエアロゾル装置からなる群から選択される方法によって投与する、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 哺乳動物が、シュードモナス(Pseudomonas)に感染している、請求項9に記載の方法。

【請求項12】 哺乳動物が嚢胞性繊維症を患っている、請求項9に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願)

本出願は、1998年11月18日付けで出願され、現在審査中の米国特許出願出願番号第09/193,877号の部分継続出願である。

【0002】

米国政府は、本発明に請求額払い込みライセンスを所有し、ナショナル インスティテューツ オブ ヘルス (National institutes of Health) により授与された補助金番号 (Grant No.) R01-HL56285 および HL56285S の条件により与えられているのと同様、手ごろな条件で他者にライセンスを与えることを特許所有者に求める権利を限定された条件下に所有する。

【0003】

(発明の分野)

本発明は、細菌感染における組換えリゾチームおよびリゾチーム／サーファクタントタンパク質－B 融合タンパク質の予防的および治療的使用に関する。

【0004】

(発明の背景)

細菌感染は、世界的罹患率および死亡率の主導的要因のまま残されている。細菌感染に対して投与される抗生物質は多くの場合に、安全であり、また有効であるが、古典的抗生物質処置に対して耐性になった細菌種全体に対して広汎な問題が存在する。従って、耐性種により感染した個人において、抗生物質の投与は不完全で、無効の処置になり、耐性種の蔓延に伴う追加の処置が必要になる。従って、抗生物質に頼らない予防的手段および代替の処置が望まれている。

【0005】

免疫無防備状態の者、最良の健康状態以下の者、新生児または老齢の患者のような十分に機能する免疫系が欠落している者、または嚢胞性繊維症などの呼吸器官を犯す疾病もしくは潰瘍性大腸炎またはスプルーなどの胃腸器官を犯す疾病を患う者等の或る種の個人において、細菌感染は重篤な病気または死さえも導く重大な結果を招くこともある。一例として、嚢胞性繊維症の患者における変質した

粘液の産生は、外分泌管の拡張、腺房組織の破壊および破壊された組織の繊維質結合組織による置換を導く。肺臓に伴うと、肺炎および気管支炎を導く。これらの患者において、肺における実質的な細菌コロニー形成が存在していても、感染の全身的散在が少ないということは、全身的免疫力は基本的に無傷であることを示すが、彼等は依然として、肺感染の恐れがある。これらの患者はしばしば、攻撃的抗生物質治療にもかかわらず、最終的に肺感染により、彼等の十代または二十代初めで死亡する。

【0006】

呼吸器官および胃腸器官は、健全な個人における細菌感染頻発部位である。正常な呼吸器官は、細菌のコロニー形成の防止を助ける自然の排除(clearance)機構を備えている。これらの機構には、細菌侵入に対する障壁として働く粘液ゲル、気道の上皮ライニング上の纖毛の推進力、および抗微生物性体液因子、例えば分泌性免疫グロブリン IgAおよび IgM、タンパク質ラクトフェリン、ペーターリジンおよびフィブロネクチン、補体成分及び酵素リゾチームの分泌が包含される。これらの抗微生物因子の中で、リゾチームは気道分泌の最も良く確立された抗微生物物質である。

【0007】

ヒトリゾチームは、天然産生酵素であり、インビトロで殺菌作用を示すことが知られており、従って細菌感染の予防および／または処置に対する有望な手段であるものと見做される。リゾチームは、大部分の組織で産生される小型(15キロダルトン)の塩基性タンパク質である。粘液などの多くの身体分泌系から分泌され、存在する。肺において、免疫組織学的方法により、タイプ(Type)II肺胞上皮細胞のラメラ体(lamellar bodies)、肺胞マクロファージおよび気管支漿液粘膜下組織腺に、リゾチームの場所が特定された。気道に分泌されるリゾチームの約80%は、上部気道の粘膜層からのものである。

【0008】

インビトロにおいて、リゾチームは独立して作用して、細菌死滅を生じることが証明されている。リゾチームが細菌を死滅させる一方法は、細菌多糖類細胞壁におけるN-アセチルムラミン酸のC-1とN-アセチルグルコサミンのC-4

との間のグリコシド結合の加水分解することによるものであることが知られている。リゾチームはまた、細菌細胞を溶解する補体または抗体などの別種のタンパク質と共働的に作用することにより細菌を殺滅する。好中球などの多形核白血球により産生されるリゾチームは、多形核白血球の化学走性を阻害、感染後の酸素フリーラジカルの産生を制限する。これは、炎症の程度を抑制するが、同時に、これらの細胞の食作用を高める。リゾチームはまた、気道組織の損傷に対する応答に含まれるものと見做される。

【0009】

リゾチームのインビトロ抗細菌作用は十分に公開されているが、従来技術において、リゾチームのこれらの作用をインビボ使用することを予測させる方法は存在しなかった。従来の報告書はまた、持続したリゾチーム投与は有害となり得ることを示唆している。

【0010】

リン脂質とタンパク質との複合混合物である肺表面活性物質は、肺胞タイプII上皮細胞である、特別な外分泌細胞で合成され、分泌される。サーファクタントタンパク質-B (SP-B) は、肺表面活性物質のタンパク質成分の1種である。正常な呼吸機能は、肺胞開通性の維持のため肺表面活性物質を必要とする。

【0011】

従って、細菌感染、特に嚢胞性繊維症の患者に頻発するような呼吸器系細菌感染を予防および／または治療処置するための方法および組成物が望まれている。

【0012】

(発明の概要)

本発明は、哺乳動物における細菌感染の予防的または治療的処置用の組成物に関する。この組成物は、配列番号 (SEQ ID NO.) : 3 のリゾチーム／サーファクタントタンパク質-B (SP-B) 融合タンパク質 (カルボキシル末端 SP-B プロペプチドおよび配列番号 : 4 の成熟 SP-B ペプチドの先行する 10 個のアミノ酸と融合されている配列番号 : 1 のラットリゾチーム) または配列番号 : 6 のリゾチーム／SP-B 融合タンパク質 (カルボキシル末端 SP-B プロペプチドおよび配列番号 : 4 の成熟 SP-B ペプチドの先行する 10 個のアミノ酸と融合

されている配列番号：5のヒトリゾチーム)、もしくは配列番号：1の組換えリゾチーム単独である。この組成物は、嚢胞性繊維症を患う個人で頻発し、もしくはその他の種類の呼吸器系疾病を有する個人で発症することがある呼吸器系感染、または胃腸器官感染を予防し、また治療する。本発明による組換えリゾチームの使用は、死亡率を減少させ、また嚢胞性繊維症を患う患者における主要気道病原体である細菌、例えばシュウドモナス エルジノーザ(*Pseudomonas aeruginosa*)のインビボにおける排除を促進する。さらにまた、リゾチームの投与により生じる気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid)中の高められたリゾチーム活性は、肺機能または構造の変質、もしくは慢性炎症性疾病を付随しない。

【0013】

本発明はまた、医薬上で許容される組成物中の配列番号：3または配列番号：6のリゾチーム／S P－B融合タンパク質を、感染の予防または治療に十分な用量計画で投与することによる哺乳動物における細菌感染の予防的または治療的処置方法に関する。投与経路は、非経口(例えば吸入による)または経口経路であることができる。

【0014】

本発明はまた、哺乳動物において抗細菌活性を有する、配列番号：1のラットリゾチームおよび配列番号：4の成熟ペプチドの10個の末端アミノ酸を有するカルボキシル末端S P－Bプロペプチドを包含する、配列番号：3の融合タンパク質に関する。

【0015】

本発明はさらにまた、哺乳動物において抗細菌活性を有する、配列番号：5のヒトリゾチームおよび配列番号：4の成熟ペプチドの10個の末端アミノ酸を有するカルボキシル末端S P－Bプロペプチドを包含する、配列番号：6の融合タンパク質に関する。

【0016】

本発明はさらに、個人に、配列番号：3または配列番号：6のリゾチーム／S P－B融合タンパク質を投与することによる、嚢胞性繊維症を患っている個人における呼吸器系細菌感染の治療方法に関する。この融合タンパク質は、エアロゾ

ル装置および／または吸入により投与することができる。

【0017】

本発明はまた、哺乳動物における細菌感染の予防的または処置的方法に関し、この方法は、医薬上で許容される組成物中の配列番号：1の組換えリゾチームを、上記感染の予防または治療に十分な用量で、例えば嚢胞性繊維症を患う患者における細菌感染の処置に十分な用量で投与することにより行われる。

【0018】

本発明はさらにまた、抗細菌活性を有する配列番号：1の組換えリゾチームを含有する組成物に関する。

【0019】

これらのおよびその他の方法および組成物は、下記の図面および詳細な説明の観点から明白になるものと見做される。

【0020】

(好適態様の詳細な説明)

組換えリゾチームおよびSP-Bおよび融合タンパク質の調製

ラットリゾチームは、配列番号：1の148個のアミノ酸の疎水性ペプチドである。配列番号：5のヒトリゾチームも、148個のアミノ酸を有し、またラットリゾチームと69%の相同性を有する。

【0021】

サーファクタントタンパク質-B (SP-B) は、肺胞空気空隙で表面活性物質リン脂質と親和的に会合している79個のアミノ酸を有する疎水性ペプチドである。ヒトSP-Bは、肺胞タイプII上皮細胞により配列番号：2の381個のアミノ酸を有するプレプロペプチドとして合成される。成熟SP-Bは、23個のアミノ酸を有するシグナルペプチド、177個のアミノ酸を有するアミノ末端(N-末端)プロペプチドおよび102個のアミノ酸を有するカルボキシル末端(C-末端)プロペプチドの順次分裂によって生成される。このC-末端プロペプチドは、SP-Bを保存するラメラ本体(lamellar bodies)の大きさを維持し、また細胞内表面活性物質プール(intracellular surfactant pool)の大きさを決定する機能を果たすことが示されている。

【0022】

ラットリゾチームおよびヒトSP-Bに相当する相補的DNA (cDNA) を合成した。この合成に用いられる計画は、Akinbi等によりJ. Biol. Chem., 1997, 272:9640~9647に記載されており、この記載を引用して、その全体として本明細書中に明白に組み入れる。ラットリゾチームに対する相補的DNAは、次のとおりにして生成した。肺胞タイプII上皮細胞を、Dobbs 等により「タイプII細胞を高収率および純度で単離するための改良方法」(An improved method for isolating Type II cells in high yield and purity) (Am. Rev. Respir. Dis., 134:140~145, 1986) に記載されているとおりに、大人のラット肺臓から単離した。総RNAは、Chirgwin等による方法（「リボヌクレアーゼに富んだ供給源からの生物学的に活性なリボ核酸の単離」(The isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease), Biochemistry, 18:5294~5299, 1979) によりタイプII細胞から単離し、またpoly A⁺ RNAは、AvivおよびLederの方法（「オリゴチミジル酸-セルロース上でのクロマトグラフィによる生物学的に活性なグロビンメッセンジャーRNAの精製」(Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69:1408~1412, 1972) によって単離した。単離されたpoly A⁺ RNAから逆転写酵素を用いて生成された一本鎖cDNA (Maniatisらによる「分子クローニング：実験指針」(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982) を、Yeh 等によるラット酵素の公開配列（「ネズミ類リゾチームの進化：ラットリゾチーム遺伝子の単離および配列」(Evolution of rodent lysozymes: Isolation and sequence of the rat lysozyme genes), Mol. Physiol. Evol., 2:25~75, 1993) に基づくオリゴヌクレオチドプライマーを用いるリゾチームの完全コード配列のPCR増幅用の鋳型として使用した。ヒトSP-B cDNAの単離は、すでに開示されている (Glasser, S. W. 等による「ヒト肺表面活性物質-会合プロテオリピッドSPL (Phe) のcDNAおよび推定アミノ酸配列」(cDNA and deduced amino acid sequence of human pulmonary surfactant-associated proteolipid SPL (Phe)), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84:4007~4011, 1987) に記載されているとおりに、ヒト肺臓から単離した。

7)。

【0023】

合成されたcDNAを、評価用にラットリゾチームタンパク質およびヒトサーファクタントタンパク質-B (SP-B) のカルボキシル末端 (C-末端) プロペプチドからなるキメラ分子へと生成させるか、または組換えラットリゾチーム (配列番号: 1) 単独を生成した。詳細には、このキメラ分子は配列番号: 4 に示されている、配列番号: 1 のラットリゾチームの残基 1 ~ 148 と配列番号: 2 の残基 270 ~ 381 との融合タンパク質であり、配列番号: 3 のリゾチーム / サーファクタント-B 融合タンパクを形成している。

【0024】

リゾチーム / SP-B 融合タンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスの調製

配列番号: 1 のラットリゾチームの完全コード配列および配列番号: 4 の成熟ペプチドのC-末端からの先行する10個のアミノ酸を伴うSP-Bの完全C-末端プロペプチドを包含するcDNA構築物を発現する3系統のトランスジェニックマウスを作り出した。配列番号: 1 のラットリゾチームのコード配列を、配列番号: 4 のヒト肺サーファクタントタンパク質-Bプロペプチドの先行する10個のアミノ酸およびC-末端プロペプチドのコード配列を用いるフレーム中でクローン形成した。配列番号: 3 の融合タンパク質をコードするトランスジェニック構築物を発現するFVB/Nトランスジェニックマウスを、3.7キロベース (kb) ヒトサーファクタントタンパク質-C (SP-C) プロモーターの制御下に、Lin 等により開示されているとおりに作成した (J. Biol. Chem., 1996, 271:19689~19695) (この刊行物を引用して、その全体を本明細書中に組み入れる)。これらのマウスにおけるトランスジェニックRNAの発現は、遠位呼吸器官上皮に限定された。

【0025】

配列番号: 3 のキメラタンパク質の発現は、当業者に公知のウエスタンブロッティング分析法により、Lin 等により報告されているとおりに生成され、確認されたSP-Bプロタンパク質のC-末端プロペプチドを検出する、抗体#R96

189 (「肺サーファクタントタンパク質-B (SP-B) の細胞内輸送にかかわる構造要件」 (Structural requirements for intracellular transport of pulmonary surfactant protein B (SP-B)), Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res., 1312:177 ~185, 1996) を用いて確認した。約29 kDa のタンパク質がこの抗体を用いて、トランスジェニックマウスで検出され、これは、配列番号: 3 の15 kDa ラットリゾチームおよび14 kDa C-末端プロペプチドおよび先行10アミノ酸からなる構築物のサイズによって予測される。このトランスジェニック生成物は、肺ホモジネートおよび気管支肺胞洗浄 (BAL) 液の両方で検出され、肺胞空隙中への配列番号: 3 のキメラタンパク質の分泌と一致した。この配列番号: 3 のキメラタンパク質の構成的発現は、肺構造の変質を付随しなかった。これは、ヘマトキシリンおよびエオシンにより染色された肺組織の光学顕微鏡評価によって評価される。

【0026】

リゾチームを過剰発現するトランスジェニックマウスの調製

肺ホストの防衛におけるリゾチームの役割を評価するために、トランスジェニックマウス系統であって、配列番号: 1 のラットリゾチームを、3.7 kb ヒトサーファクタントタンパク質-C (SP-C) プロモーターの方向で遠位気道上皮に標的を定めた。受精した卵母細胞注入からの21子孫の7つはPCRにより評価して導入遺伝子にかかわり陽性であり、これは末尾DNAのサザンブロッティング分析法により確認した (本明細書に示されている)。トランスジェニックマウスは、体重、肺重量、寿命および繁殖可能性に関して同腹野生型マウスと区別できなかった。2種のトランスジェニック系統 (3.5 および 2.6) は、気管支肺胞洗浄液中に増加した水準のリゾチームタンパク質を含有していた。

【0027】

リゾチーム/SP-B 融合タンパク質の効力

配列番号: 3 の融合タンパク質を担持する5週齢のトランスジェニックマウス (n=56) (処置群) およびそれらの野生型同腹マウス (対照) を、気管内投与によって 10^6 株IIIグループBストレプトコッカス (Streptococci) (GBS) に感染させた。GBSのアリコート、トッド ヒューイット (Todd Hewitt) 培養液中

で37℃において一夜にわたり成長させ、次いで細菌を遠心処理によりペレット化した。この細菌ペレットを、 $10^7/\text{ml}$ の濃度で無菌リン酸塩緩衝塩類溶液(PBS)中に懸濁した。この細菌懸濁液100マイクロリットル(10^6 細菌)を、気管内注入に備えて、27ゲージの針を備えたツベルクリン注射器中に採取した。注入の全部は、無菌環境で行った。

【0028】

クリーンルームに保持した5～6週齢のマウスを、細菌排除試験に使用した。マウスは、一酸化窒素と酸素との混合物により麻酔させた。中央切開及び甲状腺を貫く切開を経て気管を露出させた。細菌懸濁液100マイクロリットルを、27ゲージの針を用いて輪状軟骨のすぐ下で、気管中にたらし込んだ。二等分した甲状腺筋肉を、中央部で並置し、皮膚切開部を2つの縁端を接近させることにより手術用接着剤で閉じた。動物は6時間または24時間にわたり収容し、次いで犠牲にした。

【0029】

感染後の6時間または24時間の時点で、処置マウスおよび対照マウスから肺を採取し、その重量を測定し、PBS中でホモジネート化し、次いでBAP上にプレート形成し、GBSコロニーの形成を評価した。これらの培養プレートを、37℃で約16～18時間(一夜)、インキュベートした。肺組織1gあたりのコロニー形成単位(CFU/g)を、細菌コロニーの手計数により評価した。

【0030】

図1に示されているように、配列番号:3のキメラタンパク質を保有するトランスジェニックマウスは、GBS感染後の6時間および24時間の両方の時点で、相当に少ないCFU/肺組織gを有していた。大部分のトランスジェニックマウスのCFU数は、投与された細菌数よりも少なくなることさえあった。図1に示されているように、トランスジェニックマウスは、感染後の6時間および24時間の両方の時点で、相当に促進された肺からのGBS排除を有していた。感染後の6時間の時点で、トランスジェニック(処置した)マウスからの肺組織を接種されたBAPは、 $1.99 \pm 1.4 \times 10^4$ CFU/組織gを有していたのに対して、野生型(対照)マウスからの肺組織を接種されたBAPは、25.49

$\pm 12.43 \times 10^4$ CFU/組織 g を有していた ($p < 0.006$)。感染後の24時間の時点で、トランスジェニック (処置した) マウスからの肺組織を接種されたBAPは、 $9.9 \pm 6.43 \times 10^4$ CFU/組織 g を有していたのに対して、野生型 (対照) マウスからの肺組織を接種されたBAPは、 $67.29 \pm 34.2 \times 10^4$ CFU/組織 g を有していた ($p < 0.04$)。

【0031】

これらの結果は、トランスジェニックマウスの気道における配列番号：3のリゾチーム/サーファクタントタンパク質-B融合タンパク質の発現が気道からの細菌排除を促進することを示唆している。この結果は、配列番号：3のリゾチーム/サーファクタントタンパク質-B融合タンパク質を保有するマウスにおいて、細菌増殖が感染後の6時間の時点で抑制され、感染後の24時間の時点で細菌排除率が増強されたことを示している。遠位気道において配列番号：3のリゾチーム/サーファクタントタンパク質-B融合タンパク質を発現したトランスジェニックマウスは、それらの野生型同腹マウスに比較して、気道における細菌排除について12倍以上効率的であった。野生型マウスは、その気道における細菌排除が、元々、非常に効率的であることから、このリゾチームにより生じた効力は、特に顕著である。

【0032】

2種の別の系統の形質転換したマウスは、低レベルであるけれども、配列番号：3のリゾチーム/サーファクタントタンパク質-Bキメラタンパク質を発現した。これらの系統における細菌排除は、相当して低下したが、野生型対照マウスに比較すれば、依然として格別に高かった。リゾチーム酵素活性は、最高レベルで配列番号：3のリゾチーム/SP-B融合タンパク質を発現するトランスジェニック系統の気管支肺胞洗浄液で40%増加した (野生型同腹マウスに比較して)。この系統では、細菌排除が12倍に増大されることから、その抗細菌効果は、配列番号：4の成熟ペプチドからの先行アミノ酸を伴うSP-B C-末端プロペプチドにより付与されたもの、または配列番号：3のリゾチーム成分およびSP-Bの組合わせの作用の結果であったといえることができる；別様には、この効果は増加した配列番号：1のリゾチーム活性によるものであるといえることがで

きる。

【0033】

リゾチーム導入遺伝子発現の分析

RNA：図2Aおよび2Bを参照して、リゾチーム導入遺伝子の発現は、5週齢のトランスジェニックマウス（系統3.5）の肺組織から単離した全細胞RNA 2 μ gのノーザンブロッティング分析法により評価した。これらは図2Aのレーン4および5、ならびに図2Bのレーン3および4に示されている。対照の野生型同腹マウスは、図2Aのレーン1～3、ならびに図2Bのレーン1および2に示されている。トランスジェニック試料および対照試料の両方を、マウス相補的DNA（cDNA）（図2A）およびラットcDNA（図2B）を用いてプローブした。図2Aにおいて、内生マウスリゾチームは、2転写物よりも大きかった。ラットリゾチームとマウスcDNAとの間でクロスハイブリッド形成されることから、このマウスcDNAプローブによりラットリゾチームが検出された。

【0034】

配列番号：1のラットリゾチームに特異性のcDNAプローブは、当該リゾチーム導入遺伝子の予想されたサイズである、～1 kb複製物を検出した（図2B）。同一のRNA試料をマウスリゾチームcDNAを用いてプローブした場合（図2A）、より大きい内生マウスリゾチームmRNAおよびラットリゾチームmRNAの両方が検出された。このマウスリゾチームmRNAを、試料の正常化の内部対照として使用した。

【0035】

タンパク質：ラットリゾチームおよびマウスリゾチームは、非常に類似する分子量を有することから、これらのタンパク質をSDS-PAGEによって分割することはできなかった。リゾチームの総レベル（ラットおよびマウス）は、5週齢のトランスジェニックマウスおよび野生型同腹対照からの等量の肺ホモジネート又はBAL液由来のタンパク質のウエスタンブロッティング分析法により推定した。図3は、トランスジェニックマウス系統3.5（レーン4～6）および対照野生型同腹マウス（レーン1～3）からの総肺タンパク質1 μ gのウエスタンブロッティング分析を示している。タンパク質を、非還元性条件下にSDS

—PAGEにより分画し、ニトロセルロース膜上にブロッティングし、次いで抗ヒトリゾチーム抗体とともにインキュベートした。これによりマウスおよびラットの両方のリゾチーム（分子量約15 kD）が検出された。

【0036】

図3に示されているように、トランスジェニック系統3.5からのマウス（レーン4～6）は、肺ホモジネートおよびBAL液の両方で、野生型同腹マウス（レーン1～3）に比較して、4倍増加したリゾチームタンパク質レベルを有していた。トランスジェニック系統2.6からのマウスは、対照の野生型同腹マウス（図示されていない）に比較して、2倍増加したリゾチームタンパク質レベルを有していた。

【0037】

リゾチーム酵素活性：図4を参照して、リゾチーム酵素活性を、系統3.5（動物数(n)=4）および系統2.6（n=4）からの5週齢のトランスジェニックマウス、ならびに対照の野生型同腹マウス（n=7）からのBAL液で、濁度分析法により評価した。10ノナグラムのBAL液タンパク質を、450nmで1の光学濃度（O. D.）で懸濁したマイクロコッカス リソダイクチクス(Micrococcus lysodeikticus)とともにインキュベートした。37℃で1時間にわたりインキュベートした後、この懸濁液のO. D. の変化を測定した。精製ニワトリ卵白リゾチームを用いて、標準曲線を作成した。

【0038】

図4に示されているように、トランスジェニック系統3.5からのマウスは、野生型マウスに比較して、17.5倍増加したリゾチーム活性を有していた（野生型マウスの31単位/ng BALタンパク質に対して550単位/ng BALタンパク質）。このデータは、平均値±平均値の標準誤差（SEM）であり、野生型対トランスジェニック系統3.5の場合、 $p < 0.0001$ であり、野生型対トランスジェニック系統2.6の場合、 $p < 0.0001$ であり、およびトランスジェニック系統3.5対形質転換系統2.6の場合、 $p < 0.0008$ である。ウエスタンブロッティング分析から予測されるように、トランスジェニック系統2.6からのマウスは、野生型対照に比較して増加したリゾチーム

酵素活性（205単位／ngBALタンパク質）を有していたが（ $p=0.02$ ）、トランスジェニック系統3.5と比較すると、その活性は低かった。

【0039】

リゾチームの空間的な発現

図5Aおよび5Bを参照して、トランスジェニックマウスおよび対照マウスにおけるリゾチームタンパク質の細胞内位置の特定を得た。系統3.5からの5週齢のトランスジェニックマウス（図5B）および野生型対照同腹マウス（図5A）からのパラフィン埋め込み肺切片を、ラットおよびマウスの両方のリゾチームを検出する抗トリゾチーム抗体を用いてヘマトキシリン／エオシンにより免疫染色し、80xの倍率で写真撮影した。

【0040】

トランスジェニックマウスの肺切片の総合的構造は、野生型同腹マウスと相違していなかった。これらには、肺浮腫または血管鬱血の証拠はなく、また炎症細胞は未感染トランスジェニックマウスからの肺切片では検出されなかった。

【0041】

リゾチームは、野生型マウスおよび形質転換マウスにおいてタイプII細胞で検出され、トランスジェニックマウスからのタイプII細胞において、より強く染色された。さらに、トランスジェニックマウスは、気管支上皮細胞で発現した。野生型マウスでは、上皮リゾチームの内因性発現がタイプII細胞に限定されたのに対して、トランスジェニックマウスでは、リゾチームの発現が繊毛を持たない気管支細胞およびタイプII細胞において等しく傑出していた。

【0042】

肺構造上のリゾチーム過剰発現の効果

図6Aおよび6Bを参照して、未感染の5週齢のトランスジェニックマウス（図6A）および対照の野生型同腹マウス（図6B）からの肺のパラフィン埋め込み、ヘマトキシリン／エオシン染色切片の総合的組織学的特徴を、40xの倍率で比較した。BAL液中の総細胞数および差別的な細胞数の計測〔ジフクイック(Diff-Quick)（登録商標）により染色したサイトスピン(Cytospin)（登録商標）標本〕を行った。

【0043】

図7に示されているように、野生型同腹マウスとトランスジェニックマウスとの比較において、総細胞数またはBAL液から採取された細胞種の分布における格別の差異は存在しなかった。この場合、総細胞数については、 $p = 0.98$ であり、マクロファージについては、 $p = 0.74$ であり、またリンパ球については、 $p = 0.95$ であった。データは、平均値 \pm SEMである。

【0044】

気道からの細菌病原体排除に対するリゾチーム過剰発現の効果

グループBストレプトコッカス (GBS) の排除 気道における増加したリゾチームレベルが、細菌の肺からの排除を増大させるかどうかを測定するために、トランスジェニックマウスおよび野生型同腹対照からの肺ホモジネートの定量的培養物中の細菌数を、GBSの 10^6 コロニー形成単位 (CFU) の気管内注入後に比較した。全部の動物は、感染後の6時間の時点で犠牲にするまで生存していた。

【0045】

図8に示されている結果は、CFU/g肺組織 \pm SEMとして表わされており、野生型 (n=20) 対トランスジェニック系統3.5 (n=19) については、 $p = 0.0172$ であり、および野生型対トランスジェニック系統2.6 (n=10) については、 $p = 0.19$ である。トランスジェニック系統3.5からのマウスは、3倍に増加したGBS排除値を有していた [$2.1 \pm 0.1 \times 10^6$ CFU/g肺組織対 $6.8 \pm 0.5 \times 10^6$ CFU/g野生型マウスの肺組織、 $p = 0.0172$]。脾臓ホモジネートを接種したプレート上におけるGBSの成長により評価して、感染の全身的散在は、トランスジェニックマウスでは少なかった (27%対60%、 $p = 0.04$)。肺からのGBS排除は、トランスジェニック系統2.6からのマウスでは2倍よりも少ない程度で促進された ($4.2 \pm 0.8 \times 10^6$ CFU/g肺組織対 $7.1 \pm 0.6 \times 10^6$ CFU/g野生型マウスの肺組織、 $p = 0.19$)。

【0046】

シュードモナス エルジノーザ (Pseudomonas aeruginosa) の排除：トランスジ

エニクマウスおよび野生型マウスを、 10^7 CFUのシュードモナス エルジノーザ (*Pseudomonas aeruginosa*) による気管内注射に付した。トランスジェニックマウスは全部が、感染後の24時間の時点で犠牲にするまで生存していた。これに対して、感染した野生型マウスの20%は死亡した。

【0047】

図9は、CFU/g 肺組織±SEMを示している。細菌排除は、トランスジェニック系統3.5 (n=10) からのマウスでは約30倍促進された(野生型同腹対照における $3.24 \pm 0.41 \times 10^7$ CFU/g 肺組織 (n=10, $p=0.05$) に比較して、 $1.06 \pm 0.05 \times 10^6$ CFU/g 肺組織)。細菌排除は、トランスジェニック系統2.6 (n=10) からのマウスでは約6倍促進された ($6.52 \pm 0.71 \times 10^6$ CFU/g 肺組織、 $p=0.05$)。全身的細菌散在は、感染後の24時間の時点で生き残ったマウスで見出されなかった。

【0048】

本発明による配列番号：3または配列番号：6のリゾチーム/S P-B融合タンパク質、もしくは配列番号：1の組換えリゾチームは、気道における細菌コロニー形成の治療および/または減少のために使用することができる。後者の使用は、嚢胞性繊維症を患う個人の治療に格別に有益である。これは、主要気道の慢性細菌コロニー形成、特にシュードモナス エルジノーザ (*Pseudomonas aeruginosa*) による慢性細菌コロニー形成が、その結果生じる衰弱性悪化と共に、嚢胞性繊維症患者が受ける病的状態および死亡の主要要因であるからである。

【0049】

嚢胞性繊維症は、粘着性粘液が産生されるように粘液分泌が変質される全身的疾病である。変質した粘液の産生は、外分泌管の拡張、腺房組織の破壊、および破壊された組織の繊維質結合組織による置き換えを導く。肺が包含されると、肺炎および気管支炎が導かれる。これらの患者はしばしば、攻撃的抗生物質処置にもかかわらず、若年で、シュードモナス エルジノーザ (*Pseudomonas aeruginosa*) による最終的肺感染に屈する。従って、リゾチームまたはリゾチーム/サーファクタントタンパク質-B融合タンパク質のインビボ細菌殺滅活性は、患者がどのような呼吸機能を示しているかにかかわらず、嚢胞性繊維症の患者の気道の細

菌コロニー形成を抑制するための強力な治療性戦略を提供する。

【0050】

本発明による方法および組成物による予防的および治療的処置が総合的予防、細菌量の減少、細菌感染の重篤度の軽減または排除の範囲にわたることができることは明白である。配列番号：3もしくは配列番号：6のリゾチーム／SP-B融合タンパク質、または配列番号：1の組換えリゾチームは、呼吸器管系でコロニーを形成する全部の細菌種、例えば下記細菌種に対する防御に使用することができる：スタフィロコッカス アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、ストレプトコッカス種 (*Streptococcus species*)、ストレプトコッカス ニューモニアエ (*Streptococcus pneumoniae*)、ナイセリア メニンギチジス (*Neisseria meningitidis*)、ナイセリア ゴノローアエ (*Neisseria gonorrhoeae*)、クレブシエラ種 (*Klebsiellae species*)、プロテウス種 (*Proteus species*)、シュードモナス セパシア (*Pseudomonas cepacia*)、ヘモフィラス インフルエンザエ (*Haemophilus influenzae*)、ボルデテラ ペルタシス (*Bordetella pertussis*)、マイコプラズマ ニューモニアエ (*Mycoplasma pneumoniae*)、レジオネラ ニューモフィア (*Legionella pneumophila*)。

【0051】

さらにまた、本発明は、胃腸器官感染との戦いに使用することができる。配列番号：3または配列番号：6のリゾチーム／サーファクタントタンパク質-B融合タンパク質は、胃腸器官でコロニーを形成する細菌種、例えばサルモネラ種 (*Salmonellae species*)、シゲラエ種 (*Sigellae species*)、エシェリキア コリ (*Escherichia coli*) およびビブリオ種 (*Vibrio species*)、エルシニア エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*)、カンピロバクター フィタス ssp. ジェジュニ (*Campylobacter fetus ssp. jejuni*)、およびヘリコバクター ピロリ (*Helicobacter pylori*) などの感染を処置または予防するために、胃腸器官に目標を定めた腸経路で投与することができる。リゾチーム／SP-Bは固体または液体として、カプセル剤、錠剤、シロップなどの形態で経口投与されるように調剤することができる。

【0052】

本発明のその他の変法または態様はまた、上記説明から当業者に明白であると見做される。一例として、サーファクタントタンパク質-B以外に、サポシン(Saposin)-A、サポシン-B、サポシン-C、サポシン-D、NKリジン(NK lysin)、アモエバポールA(amoebapore A)の孔形成性ペプチドなどの構造的に関連するサポシントタンパク質ファミリーの成員などの別種の融合タンパク質を製造することができる。吸入以外の種々の投与方法、例えば注射などを使用することもできる。配列番号：3もしくは配列番号：6の融合タンパク質、または配列番号：1の組換えリゾチームは、単独で、または抗生物質治療と組合わせて、投与することができる。従って、前記態様は、本発明の範囲を制限しようとするものではない。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Weaver, Timothy E.

<120> LYSOZYME FUSION PROTEINS IN INFECTIONS

<130> CMC-127-232

<160> 6

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 148

<212> PRT

<213> RAT

<400> 1

```

Met Lys Ala Leu Leu Val Leu Gly Phe Leu Leu Leu Ser Ala Ser Val
 1           5           10           15
Gln Ala Lys Ile Tyr Glu Arg Cys Gln Phe Ala Arg Thr Leu Lys Arg
 20           25           30
Asn Gly Met Ser Gly Tyr Tyr Gly Val Ser Leu Ala Asp Trp Val Cys
 35           40           45
Leu Ala Gln His Glu Ser Asn Tyr Asn Thr Gln Ala Arg Asn Tyr Asn
 50           55           60
Pro Gly Asp Gln Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Phe Gln Ile Asn Ser Arg
 65           70           75           80
Tyr Trp Cys Asn Asp Gly Lys Thr Pro Arg Ala Lys Asn Ala Cys Gly
 85           90           95
Ile Pro Cys Ser Ala Leu Leu Gln Asp Asp Ile Thr Gln Ala Ile Gln
100           105           110
Cys Ala Lys Arg Val Val Arg Asp Pro Gln Gly Ile Arg Ala Trp Val
115           120           125
Ala Trp Gln Arg His Cys Lys Asn Arg Asp Leu Ser Gly Tyr Ile Arg
130           135           140
Asn Cys Gly Val
145

```

<210> 2
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> HUMAN

<220>
 <221> PROPEP
 <222> (0)...(0)

<400> 2
 Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys
 20 25 30
 Ala Gln Gly Pro Glu Phe Trp Cys Gln Ser Leu Glu Gln Ala Leu Gln
 35 40 45
 Cys Arg Ala Leu Gly His Cys Leu Gln Glu Val Trp Gly His Val Gly
 50 55 60
 Ala Asp Asp Leu Cys Gln Glu Cys Glu Asp Ile Val His Ile Leu Asn
 65 70 75 80
 Lys Met Ala Lys Glu Ala Ile Phe Gln Asp Thr Met Arg Lys Phe Leu
 85 90 95
 Glu Gln Glu Cys Asn Val Leu Pro Leu Lys Leu Leu Met Pro Gln Cys
 100 105 110
 Asn Gln Val Leu Asp Asp Tyr Phe Pro Leu Val Ile Asp Tyr Phe Gln
 115 120 125
 Asn Gln Ile Asp Ser Asn Gly Ile Cys Met His Leu Gly Leu Cys Lys
 130 135 140
 Ser Arg Gln Pro Glu Pro Glu Gln Glu Pro Gly Met Ser Asp Pro Leu
 145 150 155 160
 Pro Lys Pro Leu Arg Asp Pro Leu Pro Asp Pro Leu Leu Asp Lys Leu
 165 170 175
 Val Leu Pro Val Leu Pro Gly Ala Leu Gln Ala Arg Pro Gly Pro His
 180 185 190
 Thr Gln Asp Leu Ser Glu Gln Gln Phe Pro Ile Pro Leu Pro Tyr Cys
 195 200 205
 Trp Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys
 210 215 220
 Gly Ala Leu Arg Val Ala Val Ala Gln Val Cys Arg Val Val Pro Leu
 225 230 235 240
 Val Ala Gly Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile
 245 250 255
 Leu Leu Asp Thr Leu Leu Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg
 260 265 270
 Leu Val Leu Arg Cys Ser Met Asp Asp Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro
 275 280 285
 Thr Gly Glu Trp Leu Pro Arg Asp Ser Glu Cys His Leu Cys Met Ser
 290 295 300
 Val Thr Thr Gln Ala Gly Asn Ser Ser Glu Gln Ala Ile Pro Gln Ala
 305 310 315 320
 Met Leu Gln Ala Cys Val Gly Ser Trp Leu Asp Arg Glu Lys Cys Lys
 325 330 335
 Gln Phe Val Glu Gln His Thr Pro Gln Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg
 340 345 350
 Gly Trp Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr
 355 360 365

Met Ser Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu
 370 375 380

<210> 3
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Rat and Human
 <220>
 <223> Chimeric Protein

<400> 3
 Met Lys Ala Leu Leu Val Leu Gly Phe Leu Leu Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gln Ala Lys Ile Tyr Glu Arg Cys Gln Phe Ala Arg Thr Leu Lys Arg
 20 25 30
 Asn Gly Met Ser Gly Tyr Tyr Gly Val Ser Leu Ala Asp Trp Val Cys
 35 40 45
 Leu Ala Gln His Glu Ser Asn Tyr Asn Thr Gln Ala Arg Asn Tyr Asn
 50 55 60
 Pro Gly Asp Gln Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Phe Gln Ile Asn Ser Arg
 65 70 75 80
 Tyr Trp Cys Asn Asp Gly Lys Thr Pro Arg Ala Lys Asn Ala Cys Gly
 85 90 95
 Ile Pro Cys Ser Ala Leu Leu Gln Asp Asp Ile Thr Gln Ala Ile Gln
 100 105 110
 Cys Ala Lys Arg Val Val Arg Asp Pro Gln Gly Ile Arg Ala Trp Val
 115 120 125
 Ala Trp Gln Arg His Cys Lys Asn Arg Asp Leu Ser Gly Tyr Ile Arg
 130 135 140
 Asn Cys Gly Val Val Cys Arg Leu Val Leu Arg Cys Ser Met Asp Asp
 145 150 155 160
 Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro Thr Gly Glu Trp Leu Pro Arg Asp Ser
 165 170 175
 Glu Cys His Leu Cys Met Ser Val Thr Thr Gln Ala Gly Asn Ser Ser
 180 185 190
 Glu Gln Ala Ile Pro Gln Ala Met Leu Gln Ala Cys Val Gly Ser Trp
 195 200 205
 Leu Asp Arg Glu Lys Cys Lys Gln Phe Val Glu Gln His Thr Pro Gln
 210 215 220
 Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg Gly Trp Asp Ala His Thr Thr Cys Gln
 225 230 235 240
 Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr Met Ser Ser Pro Leu Gln Cys Ile His
 245 250 255
 Ser Pro Asp Leu
 260

<210> 4
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Human

<220>
 <221> PROPEP
 <222> (0)...(0)
 <223> C-terminal propeptide + 10 amino acids of mature
 SP-B

<400> 4
 Val Cys Arg Leu Val Leu Arg Cys Ser Met Asp Asp Ser Ala Gly Pro
 1 5 10 15
 Arg Ser Pro Thr Gly Glu Trp Leu Pro Arg Asp Ser Glu Cys His Leu
 20 25 30
 Cys Met Ser Val Thr Thr Gln Ala Gly Asn Ser Ser Glu Gln Ala Ile
 35 40 45
 Pro Gln Ala Met Leu Gln Ala Cys Val Gly Ser Trp Leu Asp Arg Glu
 50 55 60
 Lys Cys Lys Gln Phe Val Glu Gln His Thr Pro Gln Leu Leu Thr Leu
 65 70 75 80
 Val Pro Arg Gly Trp Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val
 85 90 95
 Cys Gly Thr Met Ser Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu
 100 105 110

<210> 5
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> Human

<220>

<400> 5
 Met Lys Ala Leu Ile Val Leu Gly Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Val
 1 5 10 15
 Gln Gly Lys Val Phe Gly Arg Cys Glu Leu Ala Arg Thr Leu Lys Arg
 20 25 30
 Leu Gly Met Asp Gly Tyr Arg Gly Ile Ser Leu Ala Asn Trp Met Cys
 35 40 45
 Leu Ala Lys Trp Glu Ser Gly Tyr Asn Thr Arg Ala Thr Asn Tyr Asn
 50 55 60
 Ala Gly Asp Arg Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Phe Gln Ile Asn Ser Arg
 65 70 75 80
 Tyr Trp Cys Asn Asp Gly Lys Thr Pro Gly Ala Val Asn Ala Cys His
 85 90 95
 Leu Ser Cys Ser Ala Leu Leu Gln Asp Asn Ile Ala Asp Ala Ala Ala
 100 105 110
 Cys Ala Lys Arg Val Val Arg Asp Pro Gln Gly Val Arg Ala Trp Ala
 115 120 125
 Ala Trp Arg Asn Arg Cys Gln Asp Arg Asp Val Arg Gln Tyr Val Gln
 130 135 140
 Gly Cys Gly Val
 145

<210> 6
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Human and Human

<220>
 <223> Chimeric Protein

<400> 6
 Met Lys Ala Leu Ile Val Leu Gly Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Val
 1 5 10 15
 Gln Gly Lys Val Phe Gly Arg Cys Glu Leu Ala Arg Thr Leu Lys Arg
 20 25 30
 Leu Gly Met Asp Gly Tyr Arg Gly Ile Ser Leu Ala Asn Trp Met Cys
 35 40 45
 Leu Ala Lys Trp Glu Ser Gly Tyr Asn Thr Arg Ala Thr Asn Tyr Asn
 50 55 60
 Ala Gly Asp Arg Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Phe Gln Ile Asn Ser Arg
 65 70 75 80
 Tyr Trp Cys Asn Asp Gly Lys Thr Pro Gly Ala Val Asn Ala Cys His
 85 90 95
 Leu Ser Cys Ser Ala Leu Leu Gln Asp Asn Ile Ala Asp Ala Ala Ala
 100 105 110
 Cys Ala Lys Arg Val Val Arg Asp Pro Gln Gly Val Arg Ala Trp Ala
 115 120 125
 Ala Trp Arg Asn Arg Cys Gln Asp Arg Asp Val Arg Gln Tyr Val Gln
 130 135 140
 Gly Cys Gly Val Val Cys Arg Leu Val Leu Arg Cys Ser Met Asp Asp
 145 150 155 160
 Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro Thr Gly Glu Trp Leu Pro Arg Asp Ser
 165 170 175
 Glu Cys His Leu Cys Met Ser Val Thr Thr Gln Ala Gly Asn Ser Ser
 180 185 190
 Glu Gln Ala Ile Pro Gln Ala Met Leu Gln Ala Cys Val Gly Ser Trp
 195 200 205
 Leu Asp Arg Glu Lys Cys Lys Gln Phe Val Glu Gln His Thr Pro Gln
 210 215 220
 Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg Gly Trp Asp Ala His Thr Thr Cys Gln
 225 230 235 240
 Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr Met Ser Ser Pro Leu Gln Cys Ile His
 245 250 255
 Ser Pro Asp Leu
 260

【図面の簡単な説明】

【図1】

トランスジェニックマウス（リゾチーム／サーファクタントタンパク質-B融合タンパク質）および対照マウスの肺からの細菌排除を示すヒストグラム。

【図2】

図2Aは、マウスリゾチーム相補的DNA（cDNA）をプローブとするトランスジェニックマウス系統における配列番号：1の組換えリゾチームの発現を示す写真であり、図2Bは、ラットcDNAをプローブとする同一のトランスジェニックマウス系統における配列番号：1の組換えリゾチームの発現を示す写真である。

【図3】

リゾチームタンパク質発現の分析を示す写真。

【図4】

気管支肺胞洗浄（BAL）液中のリゾチーム活性のヒストグラム。

【図5】

図5 Aは、野生型マウスにおけるリゾチーム細胞局在を示す写真であり、図5 Bは、トランスジェニックマウスにおけるリゾチーム細胞局在を示す写真である。

【図6】

図6 Aは、リゾチームを過剰産生する形質転換したマウスの肺構造を示す写真であり、また図6 Bは、野生型マウスにおける肺構造を示す写真である。

【図7】

BAL液の細胞組成を示すヒストグラム。

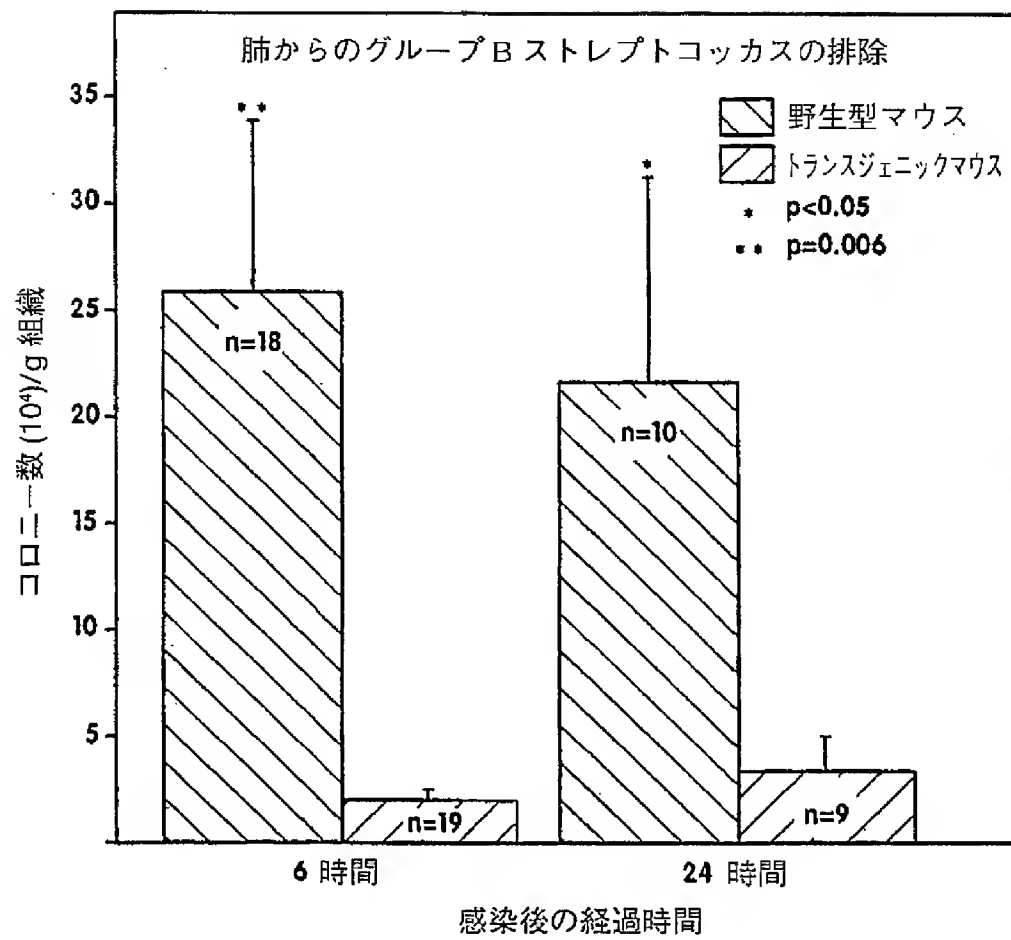
【図8】

感染後の6時間の時点における肺からのグループBストレプトコッカス(*Streptococcus*)（GBS）の排除を示すヒストグラム。

【図9】

感染後の24時間の時点における肺からのシュードモナス アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*)の排除を示すヒストグラム。

【図1】



【図2】

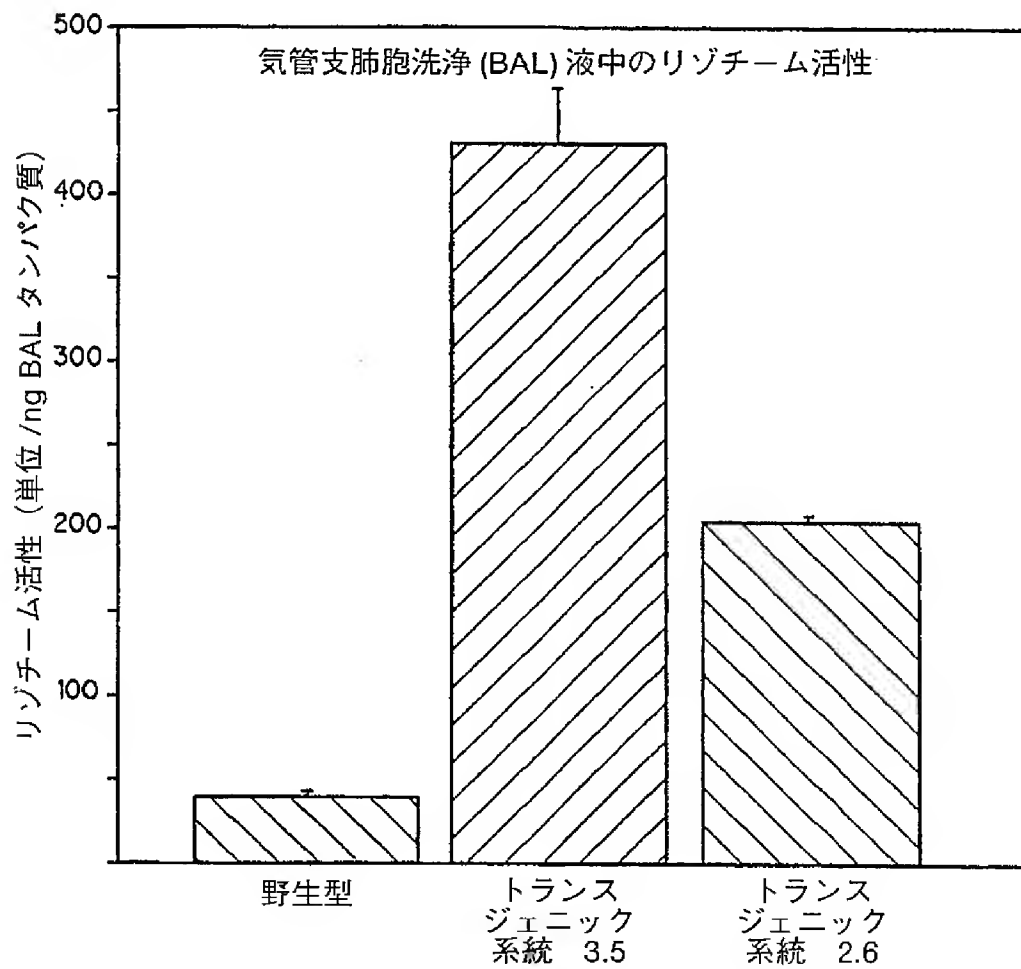


【図3】



FIG. 3

【図4】



【図5A】

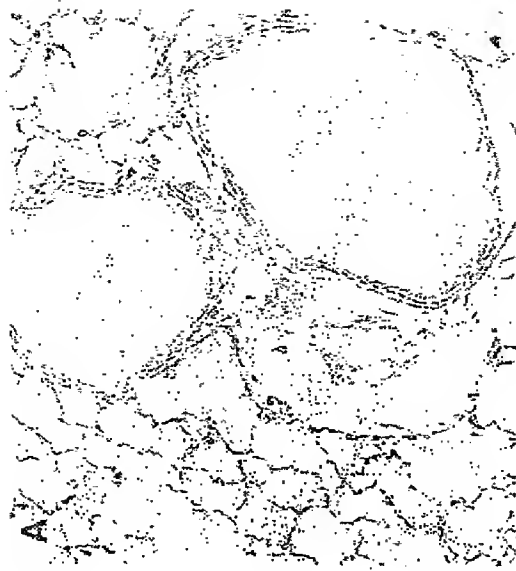


FIG. 5A

【図5B】



FIG. 5B

【図6A】

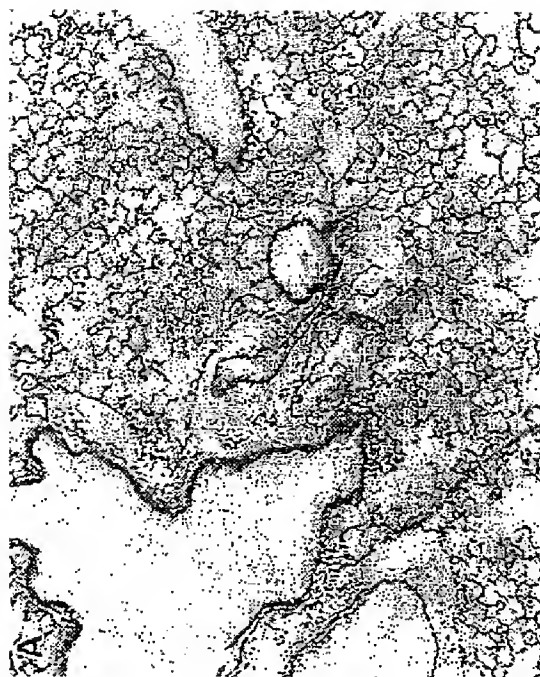


FIG. 6A

【図6B】

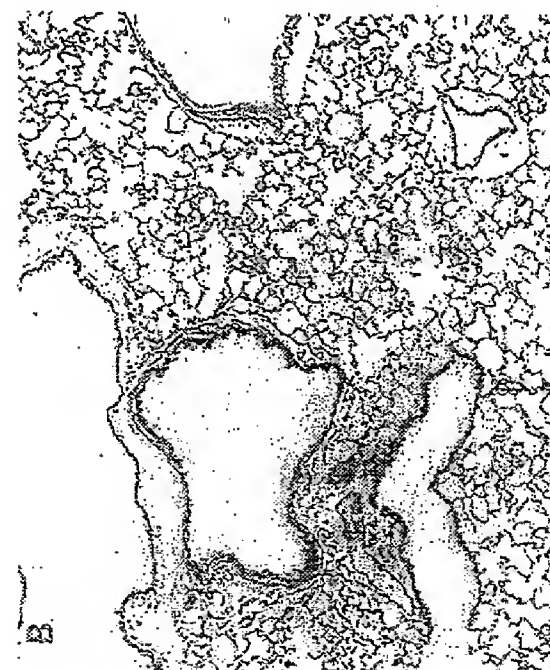
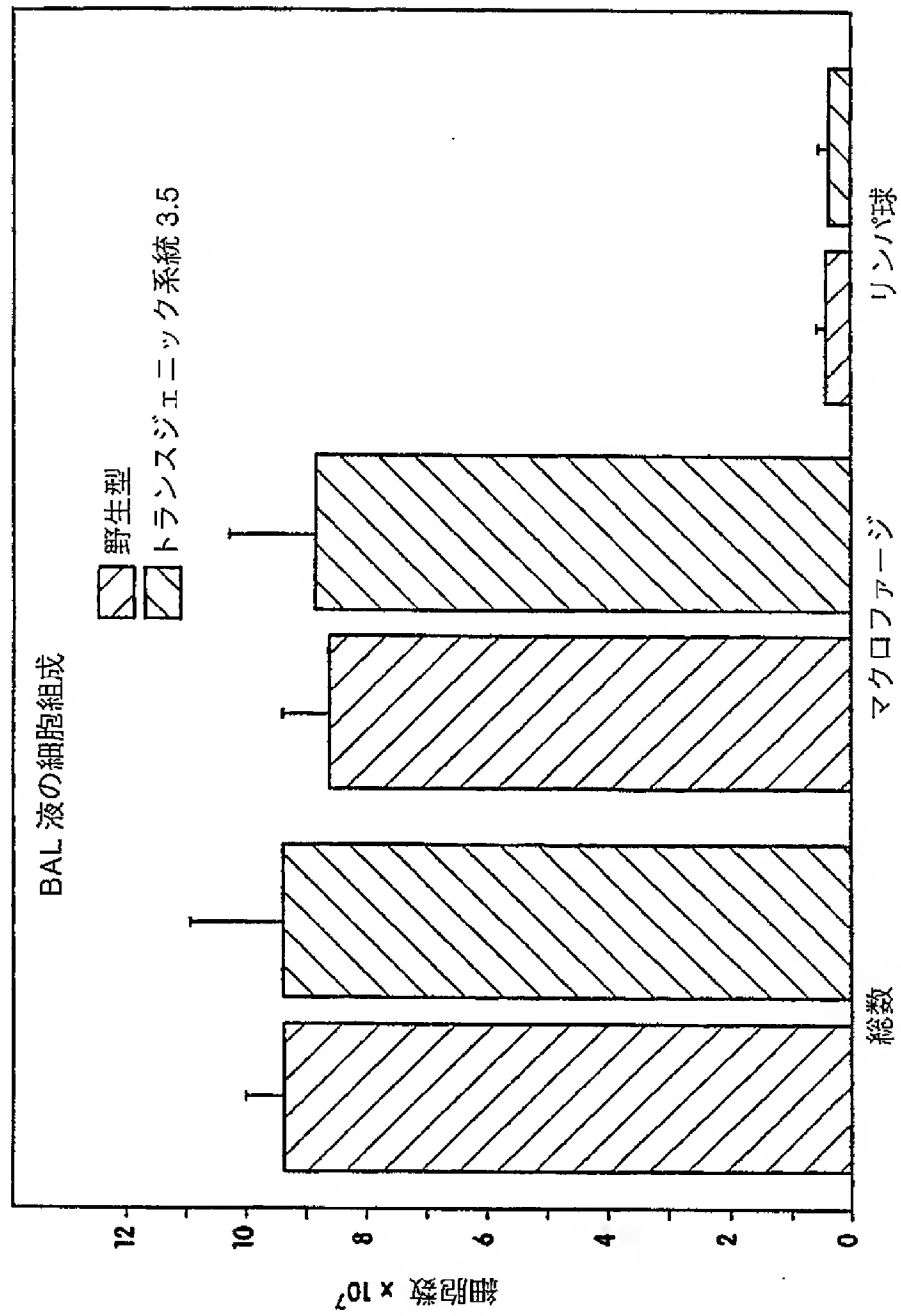
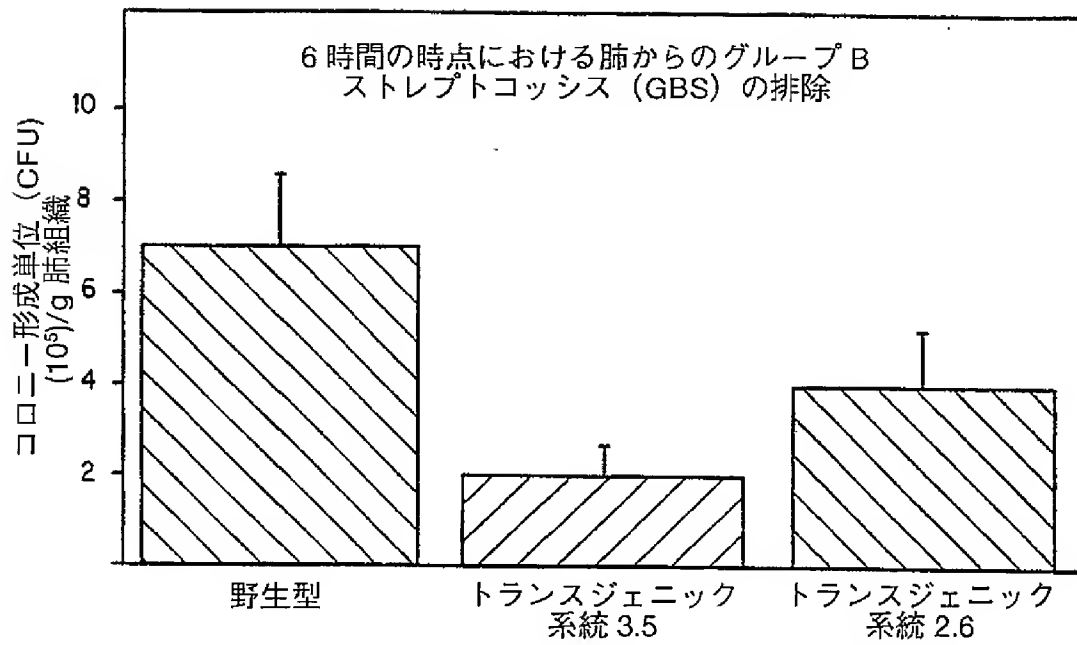


FIG. 6B

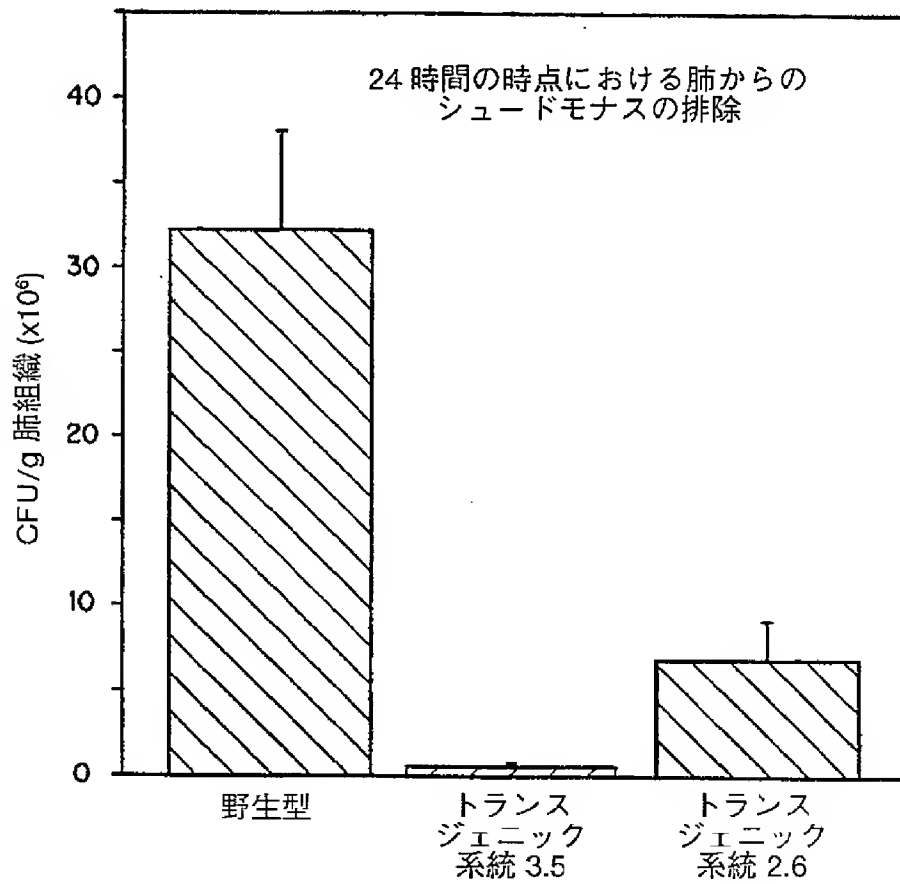
【図7】



【図8】



【図9】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Inventor: Application No. PCT/US 99/27403
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/56 C12N15/12 C12N15/62 C12M9/36 C07K14/47 A61K38/47 A61P11/00 A61P31/04 //A01K67/027				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12M C07K A61K A01K A61P				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages			Relevant to claim No.
X	EP 0 343 406 A (MEDICHEMIE AG) 29 November 1989 (1989-11-29) the whole document			2-4, 8-11
X	EP 0 222 366 A (BOEHRINGER INGELHEIM INT) 20 May 1987 (1987-05-20) page A page 3, line 1 - line 13 page 4, line 23 - line 27 claims 20, 21			2-4, 8, 9, 11
X	WHITE T.J. ET AL.: "Primary structure of rat lysozyme." BIOCHEMISTRY, vol. 16, 1977, pages 1430-1436, XP002134002 the whole document			2, 3, 8, 9, 11
-/-				
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>				
* Special categories of cited documents:				
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the published on date of another citation or other special reason (see specification)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"Z" document in member of the same patent family</p> </div> </div>				
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">24 March 2000</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">10/04/2000</div>		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentbus 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-3040, Tlx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorised officer <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Galli, I</div>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 99/27403

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CLANCY R. ET AL.: "Acute on chronic bronchitis: a model of mucosal immunology" IMMUN. CELL BIOL., vol. 73, 1995, pages 414-417, XP000891413 the whole document	1-12
A	GRIESE M. ET AL.: "Nebulization of a bovine surfactant in cystic fibrosis" EUR. RESP. J., vol. 10, 1997, pages 1889-1894, XP000891398 the whole document	1-12
A	AKINBI H.T. ET AL.: "Rescue of SP-B knockout mice with a truncated SP-B protein." J. BIOL. CHEM., vol. 272, no. 5, 11 April 1997 (1997-04-11), pages 9640-9647, XP002133931 the whole document	1-12
A	WO 90 07469 A (BENSON BRADLEY J ; WRIGHT JORAE (US)) 12 July 1990 (1990-07-12) abstract page 12	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 99/27403

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(e) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claims 9-12
are directed to a method of treatment of the human/animal
body, the search has been carried out and based on the alleged
effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such
an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all
searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment
of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report
covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is
restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (II)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

 Inventor:
 International Application No.
 PCT/US 99/27403

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0343406 A	29-11-1989	DE 3818094 C	20-07-1989
		JP 2019323 A	23-01-1990
EP 0222366 A	20-05-1987	DE 3540075 A	14-05-1987
		AT 71658 T	15-02-1992
		AU 601164 B	06-09-1990
		AU 6502986 A	14-05-1987
		DE 3683447 A	27-02-1992
		DK 538286 A	13-05-1987
		FI 864552 A,B,	13-05-1987
		GR 3003691 T	16-03-1993
		HU 43111 A,B	28-09-1987
		IE 59428 B	23-02-1994
		JP 62163692 A	20-07-1987
		KR 9405583 B	21-06-1994
		NO 174816 B	05-04-1994
		NZ 218247 A	27-08-1991
		PT 83719 A,B	01-12-1986
		US 5618712 A	08-04-1997
		ZA 8608540 A	27-07-1988
WO 9007469 A	12-07-1990	US 5006343 A	09-04-1991
		AT 109971 T	15-09-1994
		AU 638903 B	08-07-1993
		AU 5092590 A	01-08-1990
		CA 2006956 A	29-06-1990
		DE 58917603 D	22-09-1994
		DE 58917603 T	16-03-1995
		EP 0451215 A	16-10-1991
		HK 1006806 A	19-03-1999
		HU 211244 B	28-11-1995
		JP 2954343 B	27-09-1999
		JP 4503953 T	16-07-1992

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト* (参考)
A 6 1 P 31/04		C 1 2 N 9/42	
C 0 7 K 19/00		15/00	Z N A A
C 1 2 N 9/42		A 6 1 K 37/54	
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, C R, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, F I, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, I D, I L, IN, IS, J P, KE, KG, KP, KR, K Z, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, S I, S K, SL, T J, TM, TR, TT, TZ, UA, U G, U Z, V N, Y U, Z A, Z W			
Fターム(参考) 4B024 AA01 BA07 BA80 CA01 GA11			
HA01			
4B050 CC03 CC05 DD11 GG06 LL01			
4C076 AA24 AA93 BB27 CC31			
4C084 AA01 AA02 AA03 BA41 BA44			
CA53 DA41 DC02 MA13 MA56			
NA14 ZA59 ZA66 ZB35			
4H045 AA10 AA30 BA41 CA40 DA89			
EA29 FA74			